

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

02.12.03

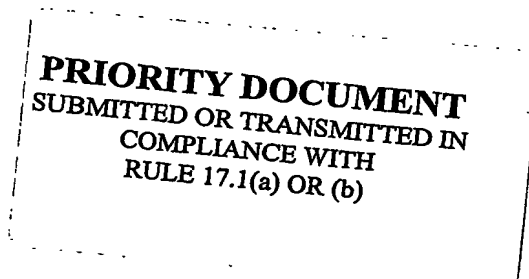
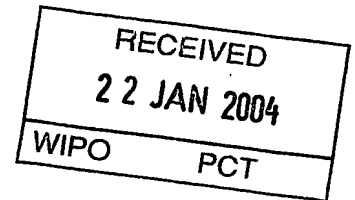
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年12月 2日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-349467
[ST. 10/C]: [JP2002-349467]

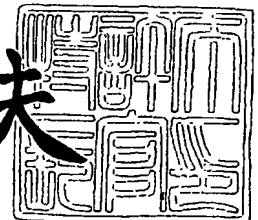
出 願 人
Applicant(s): 株式会社イーベック



2004年 1月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PEV-0002

【提出日】 平成14年12月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市北区新琴似 4 条 3 丁目 1 番 3 8 号

 【氏名】 高田 賢蔵

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市西区八軒 3 条西 4 丁目 3 番 1 1 号

 【氏名】 吉山 裕規

【特許出願人】

 【識別番号】 598124722

 【氏名又は名称】 高田 賢蔵

【特許出願人】

 【住所又は居所】 北海道札幌市西区八軒 3 条西 4 丁目 3 番 1 1 号

 【氏名又は名称】 吉山 裕規

【代理人】

 【識別番号】 230104019

 【弁護士】

 【氏名又は名称】 大野 聖二

 【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

 【識別番号】 100106840

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 森田 耕司

 【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100105991

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 玲子

【電話番号】 03-5521-1530

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 185396

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 E B ウイルスベクターのためのパッケージング細胞システム

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ウイルス複製能力を有しない E B ウイルスベクターを産生するための A k a t a パッケージング細胞を製造する方法であって、
E B ウイルス陽性 A k a t a 細胞中において E B ウイルスのパッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させ、そして
パッケージングシグナルを欠失した E B ウイルス遺伝子を保持するがパッケージングシグナルを有する野生型 E B ウイルス遺伝子を保持しない A k a t a パッケージング細胞をクローニングする、
の各工程を含む方法。

【請求項 2】 パッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させる工程が、パッケージングシグナルが欠失した相同組換え用遺伝子断片を A k a t a 細胞に導入することにより行われる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 パッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させる工程が、パッケージングシグナルが欠失した E B ウイルス遺伝子を大腸菌を用いて作製し、次に該 E B ウイルス遺伝子を E B ウイルス陽性 A k a t a 細胞に導入することにより行われる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 パッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させる工程が、パッケージングシグナルが欠失した E B ウイルス遺伝子を大腸菌を用いて作製し、次に該 E B ウイルス遺伝子を E B ウイルス陰性であって E B N A 1 を発現する A k a t a 細胞に導入することにより行われる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 ウイルス複製能力を有しない E B ウイルスベクターを産生するための A k a t a 細胞を製造する方法であって、
E B ウイルス陽性 A k a t a 細胞中において E B ウイルスのパッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させ、
パッケージングシグナルを欠失した E B ウイルス遺伝子を保持するがパッケージングシグナルを有する野生型 E B ウイルス遺伝子を保持しない A k a t a パッケージング細胞をクローニングし、そして

得られたA k a t aパッケージング細胞に、パッケージングシグナルを有するがウイルス複製能力を有しないアンプリコンプラスミドを導入する、の各工程を含む方法。

【請求項6】 ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生する方法であって、請求項5記載の方法により製造されるA k a t a細胞を溶解感染することにより、ウイルス外被に包まれたEBウイルスベクターを放出させることを含む方法。

【請求項7】 不死化B細胞を製造する方法であって、請求項5記載の方法により製造されるA k a t a細胞を溶解感染することにより、ウイルス外被に包まれたEBウイルスベクターを放出させ、そして得られたEBウイルスベクターをB細胞に感染させることを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、EBウイルスベクターを産生する方法ならびに該方法に用いるためのパッケージング細胞システムに関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞への遺伝子導入において遺伝子を標的細胞へ運ぶ働きをするものを「ベクター」という。ウイルス由来のベクターは、安全のため可能な限り元になる野生型ウイルスの遺伝子を除いたものが良い。エプスタイン・バー (E p s t e i n - B a r r) ウイルス (以下「EBウイルス」という) は、ヘルペスウイルスの一種であり、ヒトBリンパ球に感染してその増殖を促進する能力を有する。EBウイルスベクターは現在使用されている他のウイルスに基づくベクターと比較して、1) 細胞内に長期間安定して維持される；2) 100kb以上の大きな外来DNAを組み込むことができる；3) 静止期のBリンパ球、特に、初代培養Bリンパ球に高率に遺伝子導入できる；4) 抗原提示細胞であるBリンパ球に遺伝子を導入発現できる；5) 遺伝子導入されたBリンパ球を生体外で増殖させることができる；6) 大腸菌の中で組換えウイルスを作製するシステムを使用すれば、

ベクターの調整が大変容易になる、などの多くの利点を有している。

【0003】

EBウイルスを産生する細胞株としては、Akata細胞、B95-8細胞、P3HR-1細胞などが知られている。このうちAkata細胞は核内におよそ20コピーの環状のEBウイルスゲノムを持っており、抗ヒトイムノグロブリン抗体を液体培地中に加えることにより感染性EBウイルス産生を誘導できるため、EBウイルスの大量生産に適した細胞株である (Takada K, Int J Cancer 33, 27-32 (1984).; Takada K and Ono Y, J Virol 63, 445-449 (1989))。Akata細胞の長期継代により得られたEBウイルスゲノムが脱落したクローン (以下「EBウイルス陰性Akata細胞」という。) は、EBウイルスを再感染することによって、抗ヒトイムノグロブリン抗体処理によるウイルス産生能を再び示すことができる (特開平7-115966)。また、Akata細胞内で薬剤マーカー遺伝子を持つ相同組換えEBウイルスを作製し、EBウイルス産生を誘導し、EBウイルス陰性Akata細胞に再感染させて薬剤選択を行うことにより、組換えEBウイルスのみを持つAkata細胞を作製することができる。この細胞は抗ヒトイムノグロブリン抗体処理により、組換えEBウイルスを大量に産生する能力を有する (特開平8-009971)。

【0004】

EBウイルスB95-8株の環状EBウイルスDNAを大腸菌人工染色体に組み込んだ形で大腸菌内で増殖させる方法が報告されている (米国特許第6, 291, 246号)。このシステムを用いることにより、EBウイルスの複製増殖に必須の遺伝子であっても大腸菌内での相同組換えによって効率良く変異を導入できる。また、ドイツの研究グループは大腸菌内でパッケージングシグナルを除去したEBウイルスDNAを胎児の腎臓由来の293細胞に導入し、EBウイルスベクターの産生のためのパッケージング細胞として使用する方法を開示する (Delecluse HJ, Pich D, Hilsendegen T, Baum C, Hammerschmidt W. Proc Natl Acad Sci USA 96, 5188-5193 (1999))。この293細胞

に、EBウイルス初期遺伝子BZLF1とアンプリコンプラスミドを同時に外来性に導入し、発現させることでEBウイルスベクター産生を誘導するものである。しかし、このシステムはEBウイルスベクター産生のための手段が煩雑であり、しかも産生されたEBウイルスベクターの力価が大変低いため、EBウイルスベクターの大量生産には適していない。

【0005】

また、EBウイルスの外被を用いて細胞に外来遺伝子を効率良く導入するためのシステムが報告されている (Delecluse H. J, Hammerschmidt W, J Clin Pathol: Mol Pathol 2000; 53: 270-279等)。

【0006】

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。

【特許文献1】

特開平11-221073

【特許文献2】

特開平7-115966

【特許文献3】

特開平8-009971

【特許文献4】

米国特許第6,291,246号

【非特許文献1】

Takada K, Int J Cancer 33, 27-32 (1984)

【非特許文献2】

Takada K and Ono Y, J Virol 63, 445-449 (1989)

【非特許文献3】

Delecluse HJ, Pich D, Hilsendegen T, Baum C, Hammerschmidt W. Proc Nat

l Acad Sci USA 96, 5188-5193 (1999)

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを効率良く大量に産生できるシステムを提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生するためのAkataパッケージング細胞を製造する方法を提供する。該方法は、EBウイルス陽性Akata細胞中においてEBウイルスのパッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させ、そしてパッケージングシグナルを欠失したEBウイルス遺伝子を保持するがパッケージングシグナルを有する野生型EBウイルス遺伝子を保持しないAkataパッケージング細胞をクローニングする、の各工程を含む。

【0009】

好ましくは、パッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させる工程は、パッケージングシグナルが欠失した相同組換え用遺伝子断片をAkata細胞に導入することにより行われる。また好ましくは、パッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させる工程は、パッケージングシグナルが欠失したEBウイルス遺伝子を大腸菌を用いて作製し、次に該EBウイルス遺伝子をEBウイルス陽性Akata細胞に導入することにより行われる。あるいは、EBウイルス陰性であってEBNA1を発現するAkata細胞に該EBウイルス遺伝子を導入してもよい。

【0010】

別の観点においては、本発明は、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生するためのAkata細胞を製造する方法を提供する。該方法は、EBウイルス陽性Akata細胞中においてEBウイルスのパッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させ、

パッケージングシグナルを欠失したEBウイルス遺伝子を保持するがパッケージングシグナルを有する野生型EBウイルス遺伝子を保持しないAkataパッケージング細胞をクローニングし、そして得られたAkataパッケージング細胞に、パッケージングシグナルを有するがウイルス複製能力を有しないアンプリコンプラスミドを導入する、の各工程を含む。

【0011】

さらに別の観点においては、本発明は、上述の本発明の方法により製造されるAkata細胞を溶解感染することにより、ウイルス外被に包まれたEBウイルスベクターを放出させることを含む、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生する方法を提供する。

【0012】

さらに別の観点においては、本発明は、上述の本発明の方法により製造されるAkata細胞を溶解感染することにより、ウイルス外被に包まれたEBウイルスベクターを放出させ、そして得られたEBウイルスベクターをB細胞に感染させることを含む、不死化B細胞を製造する方法を提供する。

【0013】

本発明にしたがって、Akataパッケージング細胞にアンプリコンプラスミドを導入して溶解感染することにより、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを簡便かつ効率よく産生することができる。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生するためのAkataパッケージング細胞を製造する方法を提供する。

【0015】

「パッケージング細胞」とは、EBウイルス遺伝子のパッケージングシグナルが欠失した遺伝子を有し、かつウイルス粒子を作るのに必要なウイルス蛋白質を発現することができる細胞である。パッケージングシグナルとは、遺伝子がEBウイルス粒子中にパッケージされるために必要なシス作用配列であり、TR (T

terminal Repeat)とも称される。ここで、「欠失している」とは、パッケージングシグナルの全部が欠失している場合、およびパッケージングシグナルの一部が欠失または変異していることによりパッケージングシグナルとしての機能を失っている場合の両方を含む。

【0016】

「EBウイルスベクター」とは、EBウイルスの外被をまとい、ヒトB細胞に感染する能力を有するウイルス粒子を意味する。本発明にしたがって、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生することができる。

【0017】

本発明で用いるAkata細胞は既知のヒトリンパ球であり、環状EBウイルスゲノムを核内におよそ20個保有しており、相同組換え法により組換えEBウイルスを作製することができる(特開平8-009971)。また、Akata細胞は長期継代によりEBウイルスゲノムが脱落したクローンを分離できる(特開平7-115966)ことより、同様の方法により組換えEBウイルスのみを保持し、野生型EBウイルスは脱落した細胞クローンを分離できる。さらに、Akata細胞は抗ヒトイムノグロブリン抗体で処理することにより、大量のEBウイルスを産生することができる(Takada K, Int J Cancer 33, :27-32 (1984); Takada K and Ono Y, J Virol 63, 445-449 (1989))。

【0018】

本発明においては、パッケージングシグナルが欠失したEBウイルス遺伝子を用いて作製する場合には、パッケージング細胞を作製するためにEBウイルス陽性Akata細胞を用いる。EBウイルス陽性Akata細胞はEBウイルス陰性Akata細胞より外来性遺伝子の導入効率が高く、かつ安定に増殖することができるためである。あるいは、EBウイルス陰性であってEBNA1を発現するAkata細胞を用いてもよい。

【0019】

本発明の方法の概略が図1に示される。まず、EBウイルス陽性Akata細胞中においてEBウイルスのパッケージングシグナルを相同組換えにより欠失さ

せる。この工程は、パッケージングシグナルを挟む領域を有し、かつパッケージングシグナルが欠失している相同組換え用遺伝子断片をEBウイルス陽性Akata細胞に導入することにより行われる。このような遺伝子断片は、既知のEBウイルス配列に基づいて大腸菌系において作成することができる。遺伝子の導入は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、遺伝子銃法等により行うことができる。次に、薬剤耐性を利用して、パッケージングシグナルを欠失したAkata株EBウイルスと野生型ウイルスの両方を持つAkata細胞クローンを分離する。図1においては、組換えウイルスの選択にネオマイシン耐性遺伝子を使用しているが、Akata細胞で機能するどのような選択マーカーを利用してもよい。次に、分離した細胞クローンをヒドロキシウレアで処理し、再び細胞クローンに分けることにより、野生型ウイルスが脱落し、パッケージングシグナルを欠失したウイルスのみを保持するAkataパッケージング細胞を分離することができる。ヒドロキシウレアを用いずに、継代培養して限界希釈することによりクローニングすることもできる。

【0020】

あるいは、EBウイルスのパッケージングシグナルを相同組換えにより欠失させる工程は、EBウイルスDNAを大腸菌人工染色体に組み込んで大腸菌に導入し、大腸菌系で遺伝子組換えによりパッケージングシグナルが欠失したEBウイルス遺伝子を作製し、これをEBウイルス陽性Akata細胞またはEBウイルス陰性であってEBNA1を発現するAkata細胞に導入することにより行ってもよい。具体的には、Akata細胞の環状EBウイルスDNAにpBelobAC11 (Genome Systems社) 由来の大腸菌人工染色体(BAC)ベクター断片を挿入し、野生型の環状EBウイルスDNAを持つAkata細胞に導入して、相同組換えを起こしたクローンを選択する。このクローンから調製したゲノムDNAで大腸菌をトランスフォームすることにより、BACとAkata細胞EBウイルスDNAとを含むプラスミドを得る。大腸菌遺伝子組換え系においてこのプラスミド上のEBウイルスDNAの任意の部位を欠失、変異させることができる。このようにしてパッケージングシグナルを欠失させたBAC-EBウイルスDNAをAkata細胞に導入して、Akata細胞内で相同

組換えを生じさせることができる。

【0021】

本発明はまた、上述の方法により製造されるA k a t aパッケージング細胞を提供する。本発明のA k a t aパッケージング細胞にパッケージングシグナルを含む外来遺伝子（アンプリコン）を導入すると、パッケージング細胞から供給されるEBウイルス遺伝子産物を利用して、アンプリコンのDNAのみがウイルスの外被をまとしてEBウイルスベクターとして産生される。すなわち、本発明のA k a t aパッケージング細胞は、外来遺伝子を含むEBウイルスベクターを産生するためのヘルパー機能を有する。

【0022】

別の観点においては、本発明は、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生するためのA k a t a細胞を製造する方法を提供する。この方法の概略が図2に示される。上述のようにして得られたA k a t aパッケージング細胞、すなわちパッケージングシグナルを欠失したEBウイルス遺伝子を保持するがパッケージングシグナルを有する野生型EBウイルス遺伝子を保持しない細胞に、アンプリコンプラスミドを導入し、適当な薬剤で選択することにより、アンプリコンプラスミドを含有するA k a t a細胞をクローニングする。

【0023】

「アンプリコンプラスミド」とは、ウイルス産生能を欠失したウイルスプラスミドをいう。アンプリコンプラスミドは、好ましくは、パッケージングシグナル、ウイルスの複製開始点などの最小限のウイルス遺伝子と、選択のためのマーカ遺伝子などからなる外来の環状DNAである。好ましくは、アンプリコンプラスミドは、パッケージングシグナル、EBウイルス潜伏感染期の複製開始点 o r i P、EBウイルス溶解感染期の複製開始点 o r i L y t、EBNA1を有する。さらに、EBウイルスベクターを遺伝子導入の目的で用いる場合には、アンプリコンプラスミドはさらに導入すべき所望の遺伝子を有する。

【0024】

図2においては、アンプリコンプラスミドはマーカーとしてピューロマイシン耐性遺伝子を有しており、ピューロマイシンによりアンプリコンが導入されたA

k a t a細胞の選択を行っているが、A k a t a細胞で機能するどのような選択マーカーを利用してもよい。好ましくはパッケージング細胞の作製に使用した選択マーカーとは異なる選択マーカーを用いる。

【0 0 2 5】

本発明はまた、上述の方法により製造される、パッケージング細胞に導入されたアンプリコンプラスミドを含有するA k a t a細胞を提供する。本発明のアンプリコンプラスミド含有A k a t a細胞は、抗ヒトイムノグロブリン抗体で処理することにより、EBウイルスの外被をまとったアンプリコンプラスミドDNAをEBウイルスベクターとして産生する能力を有する。EBウイルスのゲノムはローリングサークル形式で伸長複製されるが、パッケージングシグナルを欠失していると切り出されず、従ってウイルス粒子に取り込まれない。一方、アンプリコンプラスミドの遺伝子もローリングサークル形式で伸長し、アンプリコンはコンカテマーを作って、パッケージングシグナルの部分で切断され、EBウイルスゲノムの大きさである170 kbのサイズでパッケージングされる（図7を参照）。すなわち、EBウイルスの外被をまとったアンプリコンプラスミドのみがEBウイルスベクターとして放出される。好ましくは、本発明の方法により製造されるアンプリコンプラスミド含有A k a t a細胞は、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを最大で従来の方法の1, 0 0 0倍以上の効率で産生し、かつ野生型EBウイルスを産生しない。

【0 0 2 6】

すなわち、別の観点においては、本発明は、上述の本発明の方法により製造されるA k a t a細胞を溶解感染することにより、ウイルス外被に包まれたEBウイルスベクターを放出させることを含む、ウイルス複製能力を有しないEBウイルスベクターを産生する方法を提供する。A k a t a細胞の溶解感染は、抗イムノグロブリン抗体で処理することにより容易に行うことができる。

【0 0 2 7】

さらに、本発明はまた、上述の方法にしたがって製造されるEBウイルスベクターを提供する。このEBウイルスベクターは、EBウイルス粒子中にアンプリコンプラスミドを含有しており、B細胞に感染してこれを不死化する能力を有す

るが、ウイルス自身を複製する能力を有しない。したがって、所望の抗体を産生するB細胞に本発明のEBウイルスベクターを感染させ、これを不死化してインビトロで増殖させることにより、ヒト抗体を容易に製造することができる。すなわち、本発明はまた、本発明のEBウイルスベクターを用いて不死化B細胞を製造する方法、ならびに本発明の方法により製造される不死化B細胞を提供する。また、アンプリコンプラスミドに所望の遺伝子を組み込んでおくことにより、従来困難だった末梢血静止期Bリンパ球への遺伝子導入が可能となる。静止期Bリンパ球においてのみ遺伝子を発現させうるプロモーターを使用することにより、Bリンパ球特異的かつ高レベルな遺伝子発現が期待できる。

【0028】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0029】

【実施例】

実施例1

本実施例では図1の方法に基づいてAkata株EBウイルスのパッケージングシグナルの破壊をおこなった。まず、pUC119にAkata株EBウイルスのBam Nhe I領域をクローニングし、pUC119 Nhe Iを作製した(図3左)。クローニングしたBam-Nhe I領域にはパッケージングシグナル(TR)が1個のみ存在した。次に、pUC119 Nhe IのBspHIとEcoRI制限酵素部位の間にネオマイシン耐性遺伝子(neo)と赤色素遺伝子(DsRed)を挿入することにより、TRが破壊された遺伝子破壊用のプラスミドpUC Nhe I neo Redを作製した(図3右)。このプラスミドDNAをEBウイルス陽性のAkata細胞に電気穿孔法で遺伝子導入を行った。

【0030】

続いてAkata細胞のネオマイシン選択を行い、耐性となった約500個のクローンに対してDNAハイブリダイゼーション法を行い、相同組換えが起こった場合に出現するサイズのDNAバンドを持つAkata細胞クローンをスクリーニングした。制限酵素BamHIで消化したDNA断片を、ネオマイシン耐性

遺伝子をプローブとして反応させ、予想される 11.6 kb のバンドを検出した。

【0031】

次に、相同組換えが起こっているか否かを遺伝子増幅法で調べた。ANC F1 および ANC R2 はそれぞれ組換え部位の 5' 端および 3' 端外側で設計したプライマーであり、ANC R1 および ANC F2 は neo の内部で設計したプライマーである。図 4 にそれぞれのプライマーのおおよその位置と方向を示す。相同組換えが起こっている場合は ANC F1 と ANC R1 のプライマーペアによって、5.3 kb の DNA 断片が増幅され、ANC F2 と ANC R2 のプライマーペアによって、10.3 kb の DNA 断片が増幅される。相同組換えが起こっていない場合は何も増幅されない。この方法で 12 個のクローンが相同組換え EB ウイルスを保持していることを確認した。

【0032】

次に、相同組換えによってパッケージングシグナルが破壊された (TR (-) ウイルスのみを持つ Akata パッケージング細胞の分離をおこなった。TR (-) EB ウイルスを保持しているクローンである 119 細胞を選択培地 (50 % EB ウイルス陰性 Akata 細胞培養上清, 0.35 mg/ml G418, 50 μ M ヒドロキシウレア) で 10 日培養後、ヒドロキシウレアを除いてさらに 10 日培養した。96 穴プレートに 1 穴あたり 0.5 個の細胞が入るように希釈して培養を行い、増殖してきたクローンから TR の外側で設計したプライマーペアによる遺伝子増幅を行い、野生型のバンド (2.0 kb) が脱落し、組換え型のバンド (5.7 kb) のみが認められる Akata 細胞クローンを分離した。さらにサザンブロット法による DNA 制限酵素切断パターンの変化から、パッケージングシグナルを欠失した EB ウイルスのみを持つ Akata パッケージング細胞が分離されたことを確認した。

【0033】

実施例 2

本実施例ではアンプリコンプラスミドを作製した。アンプリコンプラスミドとしてはパッケージングシグナル (TR) を持った構造が必要である。さらに、E

Bウイルス潜伏感染期の複製開始点 *oriP* を持っていることが導入細胞内でのプラスミドの維持に重要で、EBウイルス溶解感染期の複製開始点 *oriLyt* を持っていることが抗ヒトイムノグロブリン抗体刺激によるパッケージング細胞からのEBウイルスベクターの産生に必要である。図6右に作製したアンプリコンプラスミドを示す。EBウイルスの遺伝子としてはEBNA-1, *oriP*, TR, *oriLyt* のみを含み、さらにレポーターとして用いる緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子とアンプリコンプラスミドが細胞で維持されるための選択用のピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだ21kbのアンプリコンプラスミド (pPsi) である。ヘルパーウイルスのゲノムはローリングサークル形式で伸長複製されるが、TRを欠いているので切り出されない。従ってウイルス粒子に取り込まれることはない。一方、アンプリコンプラスミドの遺伝子もローリングサークル形式で伸長し、アンプリコンはコンカテマーを作って、TRの部分で切断され、EBウイルスゲノムの大きさである170kbのサイズでパッケージングされる (図7)。すなわち、アンプリコンプラスミドの遺伝子を持つEBウイルスが放出される。

【0034】

実施例3

本実施例では作製したpPsiをパッケージング細胞 (HU2-7) に電気穿孔法により遺伝子導入し、0.35 μ g/mlピューロマイシン, 50% EBウイルス陰性Akata細胞培養上清, 0.35 mg/ml G418で選択培養を行った。その結果得られた72個のピューロマイシン耐性クローンはすべてGFP陽性であった。そのうち1個のクローンを抗ヒトイムノグロブリン抗体で処理し、EBウイルスの構成蛋白質であるキャプシド抗原 (VCA) が発現していること、その上清に野生型ウイルスが存在しないことを確認した。さらに、上清中のアンプリコンウイルスをEBウイルス陰性Daudi細胞に感染させたところ、10%程度の細胞がアンプリコンウイルスに感染して、GFPを発現することが確認された。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明のAkataパッケージング細胞を示す。

【図 2】 図 2 は、A k a t a パッケージング細胞による E B ウイルスの増幅産生を示す。

【図 3】 図 3 は、パッケージングシグナル遺伝子のクローニングとパッケージングシグナルを破壊するためのターゲット用のプラスミドの構築を示す。

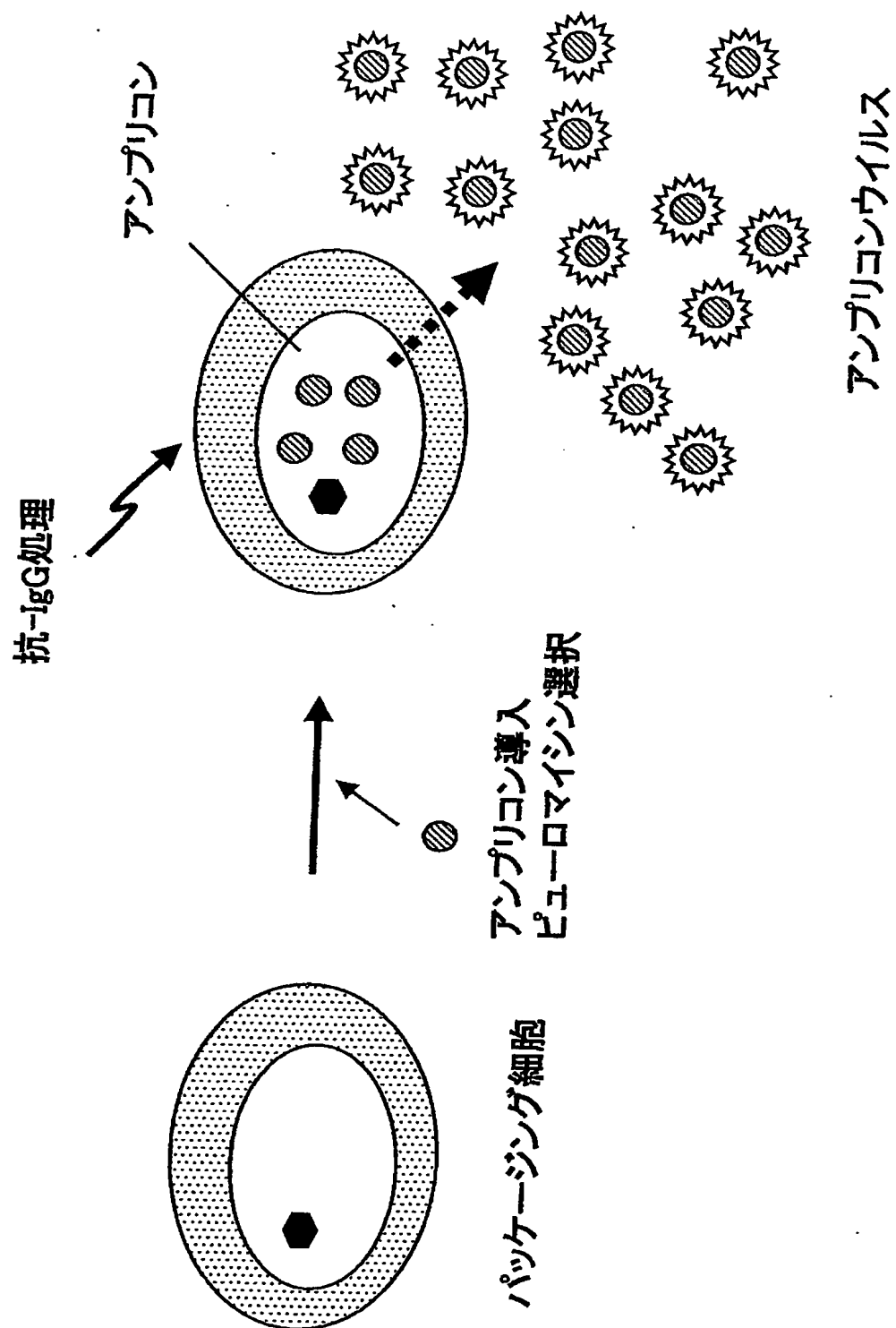
【図 4】 図 4 は、相同的遺伝子組換えの確認に用いたプライマーの位置を示す。

【図 5】 図 5 は、野生型 E B ウイルス脱落確認のための遺伝子増幅を示す。

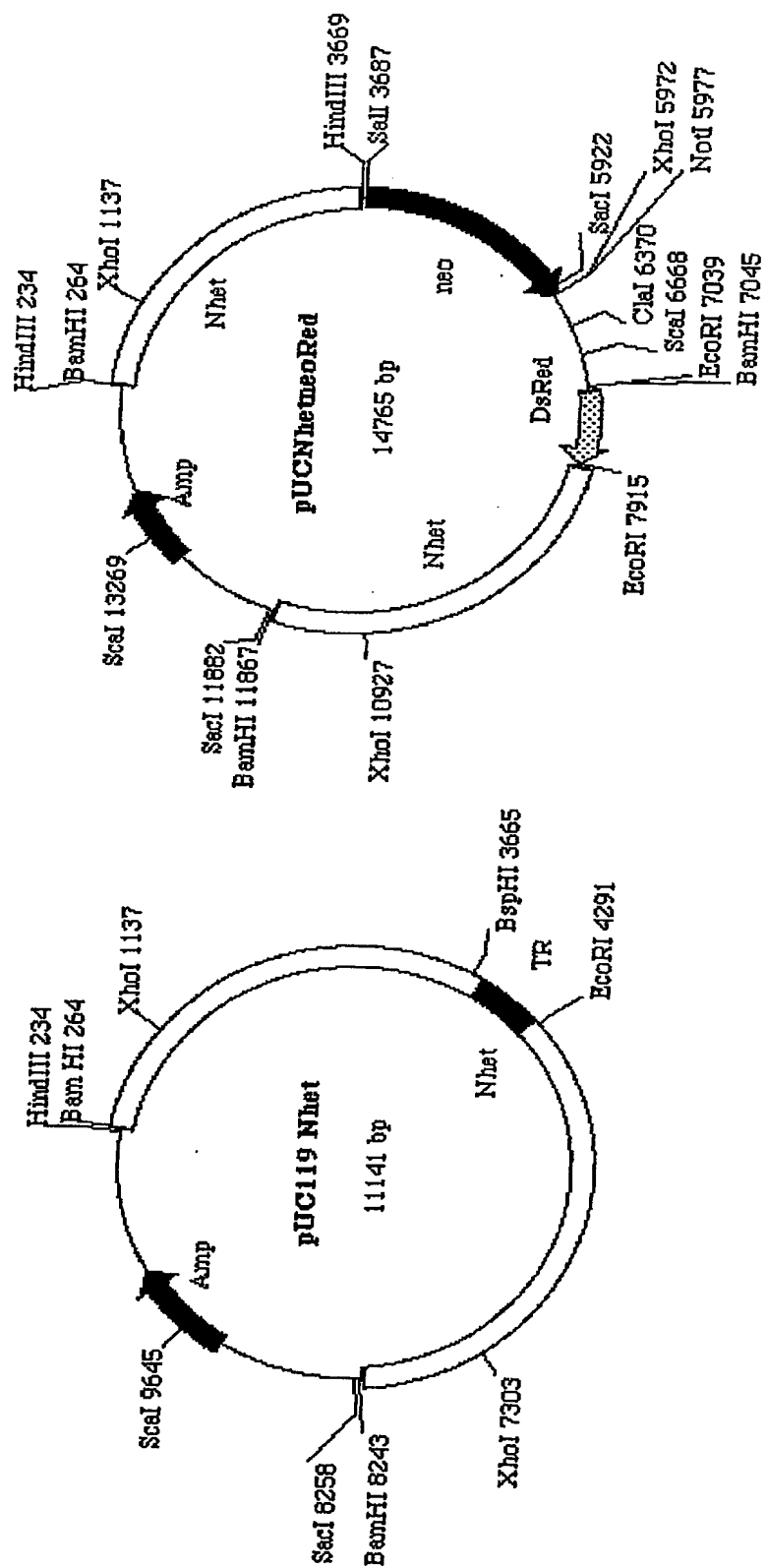
【図 6】 図 6 は、A k a t a パッケージング細胞中の E B ウイルス遺伝子およびアンプリコンプラスミドの構造を示す。

【図 7】 図 7 は、A k a t a パッケージング細胞による E B ウイルスの産生を示す。

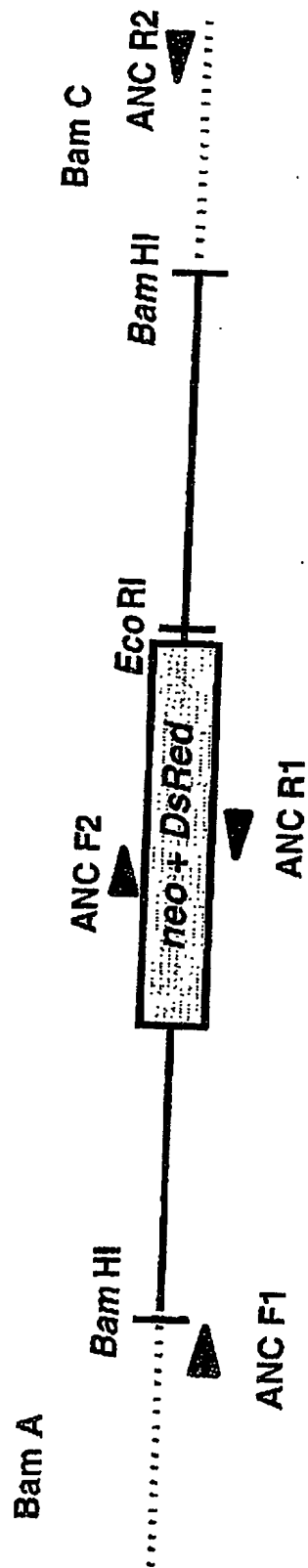
【図 2】



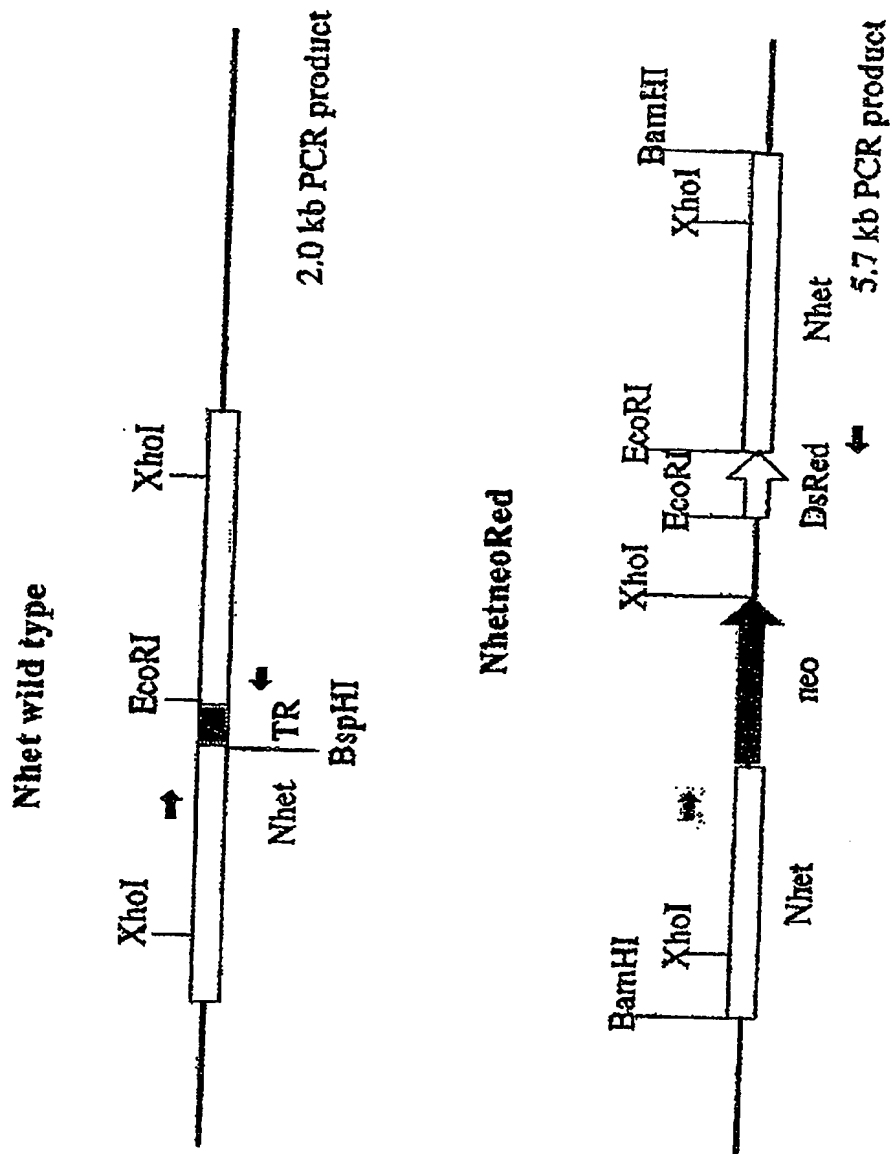
【図 3】



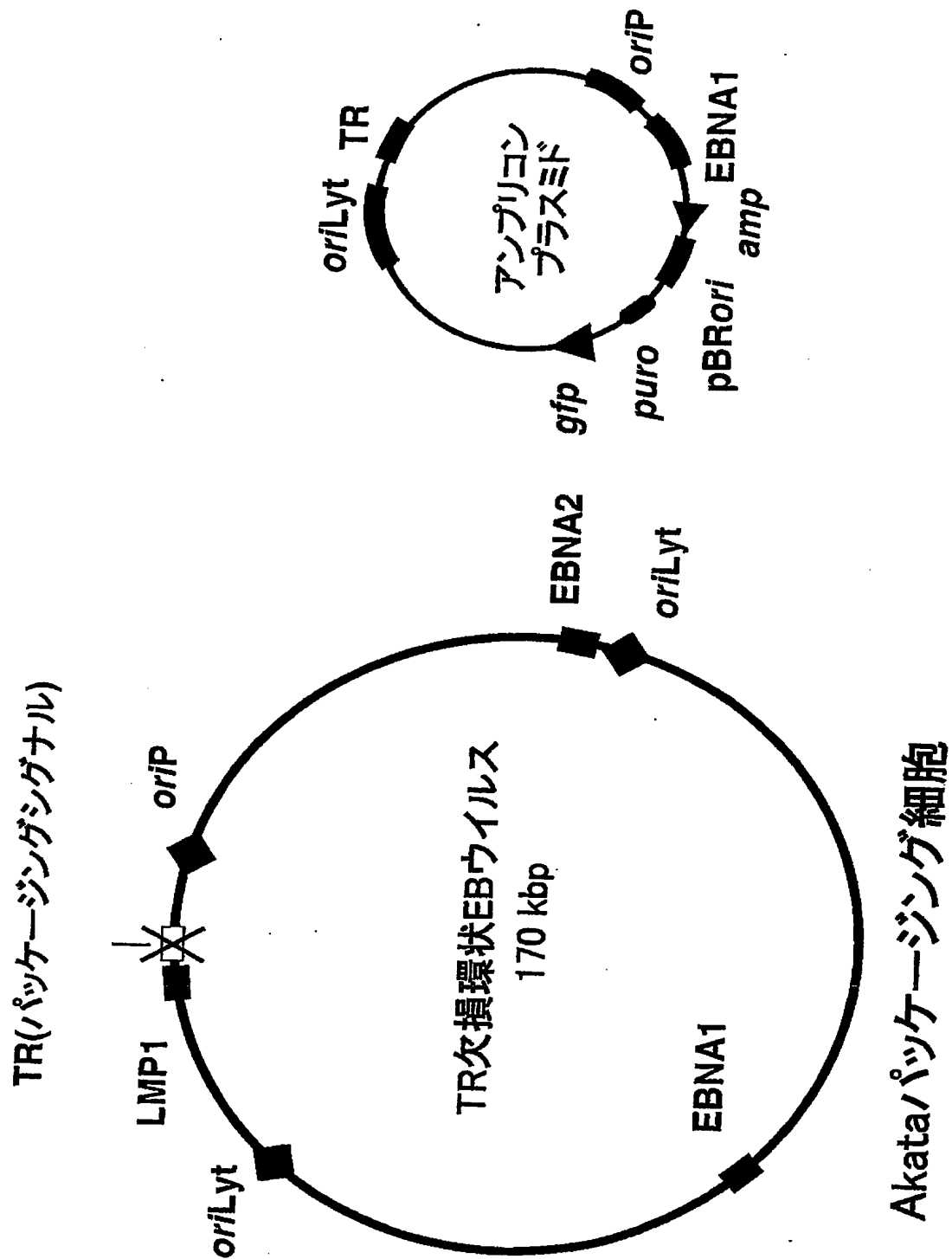
【図 4】



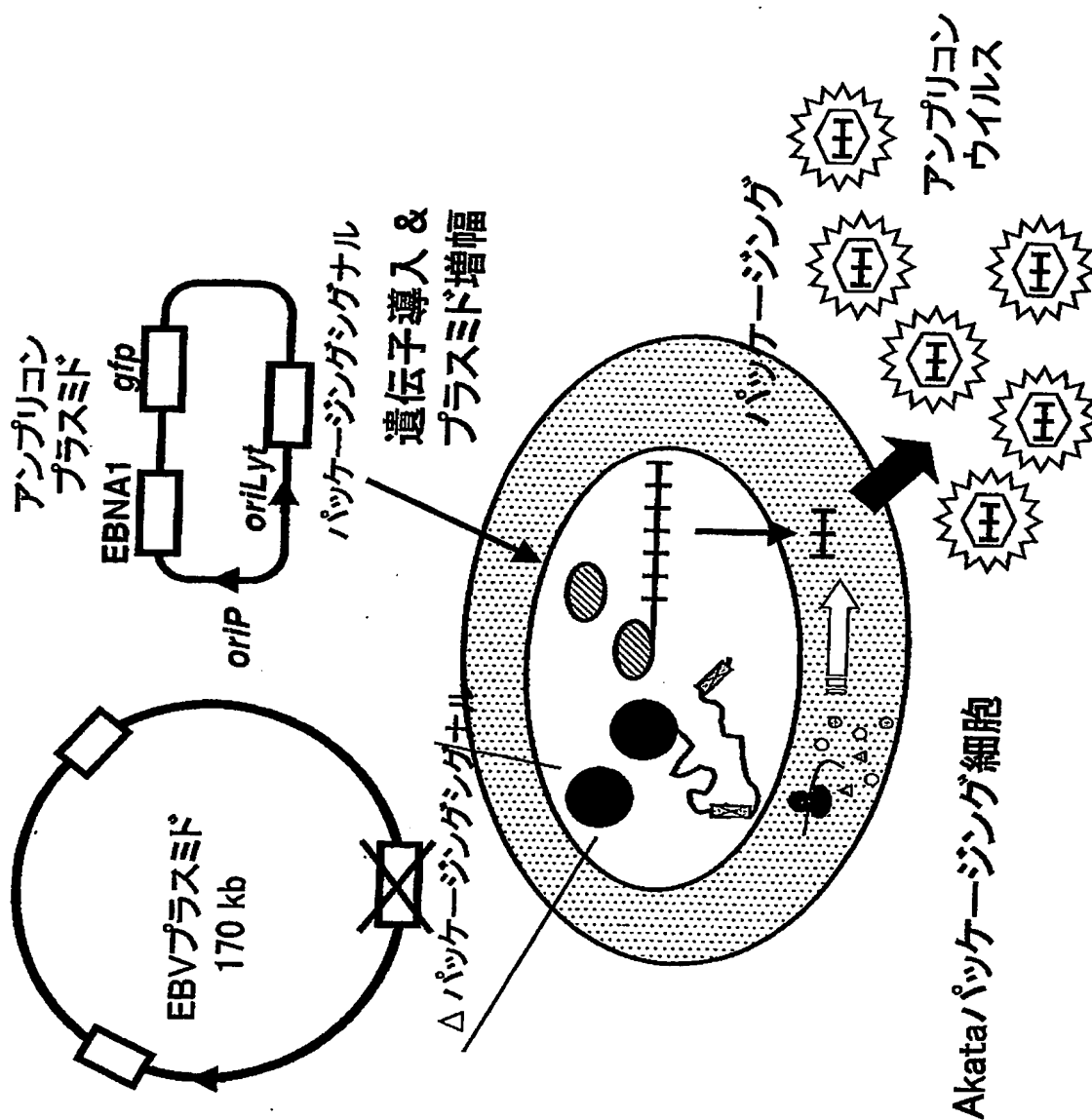
【図 5】



【図6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ウイルス複製能力を有しない E B ウイルスベクターを効率良く大量に產生できるシステムを提供すること。

【解決手段】 パッケージングシグナルを欠失した E B ウイルス遺伝子を保持するがパッケージングシグナルを有する野生型 E B ウイルス遺伝子を保持しない A k a t a パッケージング細胞を用意し、この細胞に、パッケージングシグナルを有するがウイルス複製能力を有しないアンプリコンプラスミドを導入する。この細胞を溶解感染すると、ウイルス複製能力を有しない E B ウイルスベクターが產生される。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 PEV-0002

【提出日】 平成15年 5月 1日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

 【出願番号】 特願2002-349467

【承継人】

 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区大通西 5 丁目 8 番地

 【氏名又は名称】 株式会社イーベック

【承継人代理人】

 【識別番号】 230104019

 【弁護士】

 【氏名又は名称】 大野 聖二

 【電話番号】 03-5521-1530

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 185396

 【納付金額】 4,200円

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-349467
受付番号	50300730890
書類名	出願人名義変更届
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成15年 7月24日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	503161763
【住所又は居所】	北海道札幌市中央区大通西5丁目8番地
【氏名又は名称】	株式会社イーベック
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	230104019
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-5 霞が関ビル3 6階
【氏名又は名称】	大野 聖二

特願 2 0 0 2 - 3 4 9 4 6 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 8 1 2 4 7 2 2]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 1 0 月 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

北海道札幌市北区新琴似 4 条 3 丁目 1 番 3 8 号 (番地なし)

氏 名

高田 賢蔵

特願2002-349467

出願人履歴情報

識別番号

[502435867]

1. 変更年月日

2002年12月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

北海道札幌市西区八軒3条西4丁目3番11号

氏 名

吉山 裕規

特願 2002-349467

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[503161763]

1. 変更年月日

2003年 5月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

北海道札幌市中央区大通西5丁目8番地

氏 名

株式会社イーベック